



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109917144 A

(43)申请公布日 2019.06.21

(21)申请号 201910297156.3

(22)申请日 2019.04.15

(71)申请人 郑州伊美诺生物技术有限公司

地址 450016 河南省郑州市经济技术开发区  
第六大街133号1号厂房

(72)发明人 代春迎 田晓平 侯鹏云 赵巧辉  
李桂林 付光宇 吴学炜 杨增利

(74)专利代理机构 郑州异开专利事务所(普通合伙)  
41114

代理人 王霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/94(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图1页

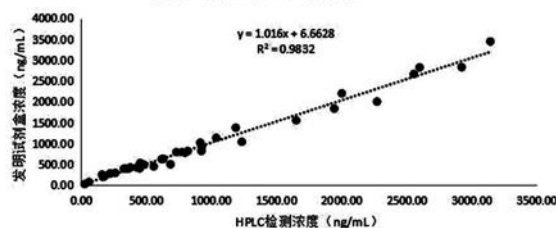
## (54)发明名称

一种甲氧基去甲肾上腺素特异性抗体的制备方法及其应用

## (57)摘要

本发明公开了一种甲氧基去甲肾上腺素特异性抗体的制备方法,所述甲氧基去甲肾上腺素特异性抗体是以甲氧基去甲肾上腺素偶联载体蛋白制备人工抗原作为免疫原,免疫实验动物得到。本发明使用甲氧基去甲肾上腺素偶联载体蛋白作为免疫原,制备了特异性抗甲氧基去甲肾上腺素的抗体,运用本发明制备的特异性抗体建立检测样本中甲氧基去甲肾上腺素的ELISA试剂盒,与肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺、甲氧基肾上腺素无交叉反应,可以快速准确地检测样本中的甲氧基去甲肾上腺素含量,具备更高的灵敏度和特异性。

发明试剂盒与HPLC相关性



1. 一种甲氧基去甲肾上腺素特异性抗体的制备方法,其特征在于:所述甲氧基去甲肾上腺素特异性抗体是以甲氧基去甲肾上腺素偶联载体蛋白制备人工抗原作为免疫原,免疫实验动物得到。

2. 根据权利要求1所述的甲氧基去甲肾上腺素特异性抗体的制备方法,其特征在于:所述载体蛋白为牛血清白蛋白、钥孔血蓝蛋白或者卵清白蛋白。

3. 权利要求1的甲氧基去甲肾上腺素特异性抗体在制备甲氧基去甲肾上腺素检测试剂盒中的应用,其特征在于:将制备的抗体包被在固相载体上,用生物素化的酰化剂将样本进行处理,使样本中酰化后的甲氧基去甲肾上腺素被固相载体上的抗体识别并结合;洗去未结合的酰化剂后,加入用辣根过氧化物酶标记的亲合素;再次洗涤后,加入底物溶液,定量检测样本中的甲氧基去甲肾上腺素的含量。

4. 根据权利要求3所述的甲氧基去甲肾上腺素特异性抗体在制备甲氧基去甲肾上腺素检测试剂盒中的应用,其特征在于:所述固相载体为磁微粒或者微孔板;所述的酰化剂为6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯、N-[6-(生物素氨基)己酰基]-6-氨基己酸N-琥珀酰亚胺酯或N-琥珀酰亚胺基6-生物素氨基己酸。

5. 根据权利要求3所述的甲氧基去甲肾上腺素特异性抗体在制备甲氧基去甲肾上腺素检测试剂盒中的应用,其特征在于:所述的样本为血清、血浆或尿液。

## 一种甲氧基去甲肾上腺素特异性抗体的制备方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断技术,尤其是涉及一种甲氧基去甲肾上腺素特异性抗体的制备方法,本发明还涉及制备出的特异性抗体在检测样本中甲氧基去甲肾上腺素含量试剂盒中的应用。

### 背景技术

[0002] 嗜络细胞瘤(Pheochromocytoma,PHEO)是主要来源于肾上腺髓质、交感神经节或其他部位的嗜络组织。诊断嗜络细胞瘤的主要标志物包括儿茶酚胺(Catecholamine,CA)及其代谢物甲氧基肾上腺素(Metanephrine,MN)、甲氧基去甲肾上腺素(Normetanephrine,NMN)。

[0003] 目前检测血浆或者尿液中的儿茶酚胺及其代谢物如MN和NMN是临床上诊断嗜络细胞瘤的主要方法。常用的检测方法包括高效液相色谱法(HPLC)、毛细管电泳法(CE)、质谱法(MS)、气象色谱法(GC)、生化法以及酶联免疫吸附法(ELISA)等。临床使用时,这些方法各有优缺点,HPLC法结果准确度高,但耗时较长,成本较高;生化法和酶联免疫吸附法操作简单,但特异性和灵敏度仍需进一步提高。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种甲氧基去甲肾上腺素特异性抗体的制备方法,由本发明制备的抗体建立的甲氧基去甲肾上腺素检测试剂盒,可以快速准确的检测样本中的甲氧基去甲肾上腺素含量。

[0005] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

本发明所述的甲氧基去甲肾上腺素特异性抗体的制备方法,所述甲氧基去甲肾上腺素特异性抗体是以甲氧基去甲肾上腺素偶联载体蛋白制备人工抗原作为免疫原,免疫实验动物得到;所述免疫原的具体制备方法为:

第一步,用0.05mol/L、pH=4.7的MES缓冲液将载体蛋白溶解为4mg/ml;用0.05mol/L、pH=4.7的MES缓冲液将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶解为20mg/ml;用0.05mol/L、pH=4.7的MES缓冲液将甲氧基去甲肾上腺素溶解为2mg/ml;

第二步,将甲氧基去甲肾上腺素与载体蛋白按照200:1(W/W)比例加入反应杯中,室温混匀,按照1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐:甲氧基去甲肾上腺素=1:50(W/W)的比例计算1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的用量,室温缓慢加入反应杯中,室温避光反应过夜;

第三步,用0.01mol/L、pH=7.2的PBS缓冲液将反应液在4℃环境中透析12h,即得到免疫原。

[0006] 所述载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA)、钥孔血蓝蛋白(KLH)、卵清白蛋白(OVA)等。所用的试验动物可采用常规的动物模型,如小鼠、豚鼠、兔子、山羊、绵羊或马等。

[0007] 本发明所述的甲氧基去甲肾上腺素特异性抗体在制备甲氧基去甲肾上腺素检测

试剂盒中的应用:将制备的抗体包被在固相载体上,用生物素化的酰化剂将样本进行处理,使样本中酰化后的甲氧基去甲肾上腺素被固相载体上的抗体识别并结合;洗去未结合的酰化剂后,加入用辣根过氧化物酶标记的亲合素;再次洗涤后,加入底物溶液,定量检测样本中的甲氧基去甲肾上腺素的含量。

[0008] 所述固相载体可以是磁微粒或者微孔板;所述的酰化剂可以为6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯、N-[6-(生物素氨基)己酰基]-6-氨基己酸N-琥珀酰亚胺酯、N-琥珀酰亚胺基6-生物素氨基己酸等。

[0009] 所述的样本为血清、血浆或尿液。

[0010] 本发明的优点在于使用甲氧基去甲肾上腺素偶联载体蛋白作为免疫原,制备了特异性抗甲氧基去甲肾上腺素的抗体,运用本发明制备的特异性抗体建立检测样本中甲氧基去甲肾上腺素的ELISA试剂盒,与肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺、甲氧基肾上腺素无交叉反应,可以快速准确地检测样本中的甲氧基去甲肾上腺素含量,具备更高的灵敏度和特异性。

## 附图说明

[0011] 图1是用本发明抗体建立的检测试剂盒与HPLC检测方法相关性图示。

## 具体实施方式

[0012] 下面通过具体实施例对本发明方法作更加详细的说明,以便于本领域技术人员对本申请的理解。如无特殊说明,本申请中所用的试剂和仪器均为本领域常规产品,本申请中所用的试验方法也为本领域中常规方法。

[0013] 实施例1 制备甲氧基去甲肾上腺素免疫原(载体蛋白选择KLH)

第一步,用0.05mol/L、pH=4.7的MES缓冲液将KLH溶解为4mg/ml;用0.05mol/L、pH=4.7的MES缓冲液将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶解为20mg/ml;用0.05mol/L、pH=4.7的MES缓冲液将甲氧基去甲肾上腺素溶解为2mg/ml;

第二步,将甲氧基去甲肾上腺素与KLH按照200:1(W/W)比例加入反应杯中,室温混匀,按照1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐:甲氧基去甲肾上腺素=1:50(W/W)的比例计算1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的用量,室温缓慢加入反应杯中,室温避光反应过夜;

第三步,用0.01mol/L、pH=7.2的PBS缓冲液将反应液在4℃环境中透析12h,即得到免疫原。

[0014] 实施例2 制备甲氧基去甲肾上腺素特异性抗体(试验动物模型选择用新西兰大白兔)

将实施例1中制备的免疫原用弗氏完全佐剂充分乳化后,皮下多点对体重为2.5kg左右的雄性新西兰大白兔进行免疫,首次免疫剂量为2mg/只;第一次免疫后间隔28天、56天分别进行第二次和第三次免疫,免疫原与弗氏不完全佐剂等体积混匀乳化后免疫,免疫剂量为1mg/只。第3次免疫10天后,兔耳静脉采血,多抗血清Protein A柱进行纯化,得到特异性抗甲氧基去甲肾上腺素多克隆抗体。

[0015] 实施例3 建立甲氧基去甲肾上腺素ELISA检测试剂盒(其固相载体选择采用磁微

粒)

#### 1、磁微粒包被

取30  $\mu$ l混匀后的磁微粒原液用300  $\mu$ l的PBS缓冲液洗涤5次,然后用10%的戊二醛对磁微粒活化1小时,接着用pH 7~8 PBS缓冲液将活化后的磁微粒洗涤2次;将甲氧基去甲肾上腺素抗体按照0.3  $\mu$ g/人份的量加入磁珠中,4℃包被2小时。最后用含BSA的封闭液封闭2小时,封闭后的磁珠2-8℃保存备用。

#### [0016] 2、样本的前处理

取尿液样本50 $\mu$ l加入到反应杯中,加入0.1mol/L的盐酸300 $\mu$ l,样本混匀后60℃酸化处理2h,冷却至室温后加入100 $\mu$ l的生物素化的6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯,室温酰化处理30min后进行检测。

#### [0017] 3、样本检测

收集来自医院的用HPLC方法定值的嗜络细胞瘤患者样本40例,经过酰化处理后取50 $\mu$ l转移至另一个反应杯中,每个反应杯中加入包被有抗甲氧基去甲肾上腺素抗体的磁微粒悬液20 $\mu$ l,混匀后37℃反应15min;反应后洗涤5次,每个反应杯中加入HRP标记的亲素100 $\mu$ l,震荡混匀后37℃反应17min;反应后洗涤5次,每个反应杯中加入发光底物A和发光底物B混合液100 $\mu$ l,混匀后避光反应5min进行检测。

[0018] 用本发明制备的抗甲氧基去甲肾上腺素抗体建立的ELISA检测试剂盒和HPLC方法同时对40例临床诊断为肾上腺皮质增生、高血压、嗜络细胞瘤、原发性甲状腺机能亢进等的尿液样本进行检测,检测结果与HPLC方法检测结果相关性如图1所示: $y=1.1016x+6.6628$ ,  $R^2=0.9832$ 。

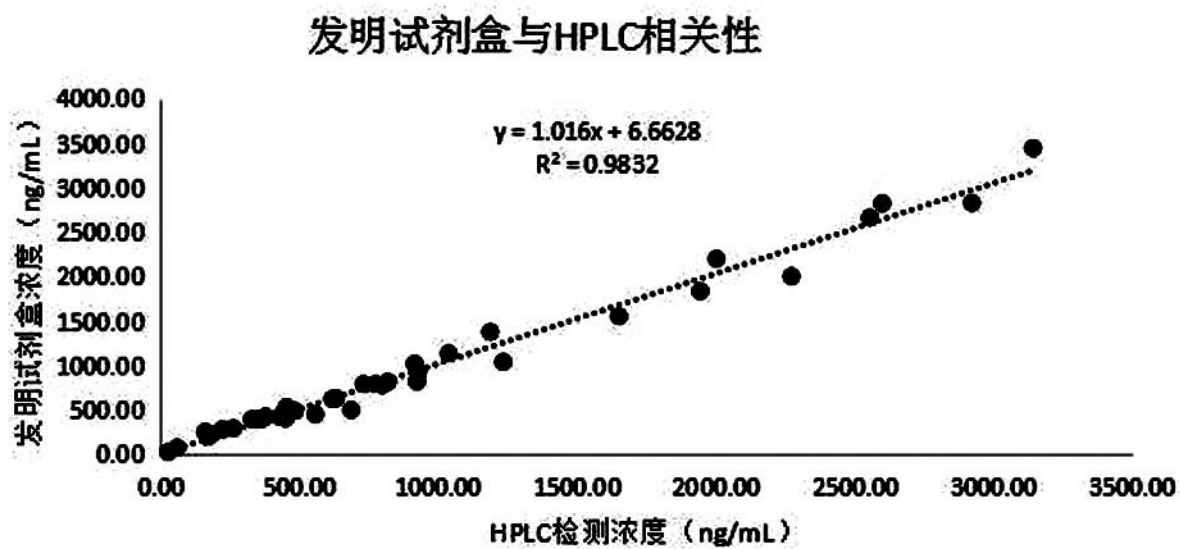


图1

专利名称(译)	一种甲氧基去甲肾上腺素特异性抗体的制备方法及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN109917144A</a>	公开(公告)日	2019-06-21
申请号	CN201910297156.3	申请日	2019-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	郑州伊美诺生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州伊美诺生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州伊美诺生物技术有限公司		
[标]发明人	代春迎 田晓平 侯鹏云 赵巧辉 李桂林 付光宇 吴学炜 杨增利		
发明人	代春迎 田晓平 侯鹏云 赵巧辉 李桂林 付光宇 吴学炜 杨增利		
IPC分类号	G01N33/94 G01N33/532 G01N33/535 G01N33/543		
代理人(译)	王霞		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种甲氧基去甲肾上腺素特异性抗体的制备方法，所述甲氧基去甲肾上腺素特异性抗体是以甲氧基去甲肾上腺素偶联载体蛋白制备人工抗原作为免疫原，免疫实验动物得到。本发明使用甲氧基去甲肾上腺素偶联载体蛋白作为免疫原，制备了特异性抗甲氧基去甲肾上腺素的抗体，运用本发明制备的特异性抗体建立检测样本中甲氧基去甲肾上腺素的ELISA试剂盒，与肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺、甲氧基肾上腺素无交叉反应，可以快速准确地检测样本中的甲氧基去甲肾上腺素含量，具备更高的灵敏度和特异性。

发明试剂盒与HPLC相关性

